

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年9月25日(25.09.2014)



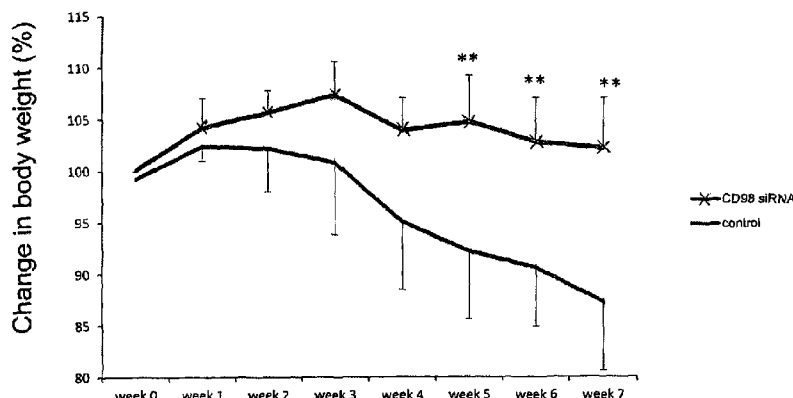
(10) 国際公開番号
WO 2014/148216 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054778
 - (22) 国際出願日: 2014年2月14日(14.02.2014)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ:
特願 2013-057341 2013年3月19日(19.03.2013) JP
 - (71) 出願人: 国立大学法人徳島大学 (THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目2番地 Tokushima (JP).
 - (72) 発明者: 安友 康二 (YASUTOMO, Koji); 〒7708503 徳島県徳島市新蔵町3丁目1番地の15 国立大学法人徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部医療創生科学部門 生体防御医学分野内 Tokushima (JP).
 - (74) 代理人: 鮫島 睦, 外 (SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).
 - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))
 — 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

(54) 発明の名称: 炎症性腸疾患の治療用医薬組成物

図3



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a pharmaceutical composition for the treatment of inflammatory bowel disease and a treatment method therefor. A pharmaceutical composition containing siRNA inhibiting the expression of a CD98 heavy chain was found to be useful in the treatment of inflammatory bowel disease. As a result, a novel treatment method can be provided that uses the siRNA for inflammatory bowel disease for which there has conventionally been no appropriate treatment method.

(57) 要約: 本発明は、炎症性腸疾患の治療用医薬組成物と治療法を提供することを目的とする。CD98重鎖を発現抑制するsiRNAを含有する医薬組成物が、炎症性腸疾患の治療に有用であることを見出した。その結果、これまで適切な治療方法がなかった炎症性腸疾患に上記siRNAを使用する新たな治療方法が提供できるようになった。

WO 2014/148216 A1

明 細 書

発明の名称

炎症性腸疾患の治療用医薬組成物

5 技術分野

本発明は、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎及び／又はクローン病）に対する新規治療剤に関するものである。より詳細には、本発明は、CD98のsiRNAを中心とする、CD98の機能性核酸を有効成分とする潰瘍性大腸炎及び／又はクローン病の治療用医薬組成物に関するものである。

10

背景技術

潰瘍性大腸炎は、1970年代に特定疾患（難病）として指定されたかなり希少な疾患であり、原因が不明なため、対症療法的な治療が多く、治療方法としては確立できていない状況である。しかしながら、最近、患者数は急増しており、1985年には1万人超であったが、2002年には、7万7000人となり、2008年には10万人を超えている（厚生労働省調べ）。そして、患者の発症率に性別の差はなく、発症年齢もあらゆる年代に分布しているが、30歳代をピークに20～50歳代に多く分布している。

15

20

クローン病も、潰瘍性大腸炎と同様に、消化管に原因不明の潰瘍を発症する疾患であり、20才台の若年者に多く見られる慢性の炎症疾患である。クローン病も潰瘍性大腸炎と同様に、最近患者数が増加している。クローン病も潰瘍性大腸炎と同様に厚生労働省により特定疾患治療研究対象疾患に指定されており、潰瘍性大腸炎と似ている点も多く、2つをまとめて炎症性腸疾患と呼ばれている。

25

これら炎症性腸疾患の原因は、遺伝的要因とそれに基づく腸管での異常な免疫反応のためとする説もあるが、疾患の原因はまだ解明されていない。患者数の増加は、食生活の欧米化によるものと言われており、その原因の一つとして、食物中の物質や微生物が抗原となって異常反応を引き起こすと考えられている。

上記炎症性腸疾患の治療のために、現在、幾つかの治療方法が報告されている。例えば、s i R N Aを使用する治療方法としては、腫瘍壊死因子受容体2 (T N F R 2) のs i R N Aを使用して、T N F R 2の発現を抑制し、炎症性腸疾患の治療を行うことが報告されている(特許文献1)。あるいは、s i R N Aを使用して、アポトーシス因子5 A 1 (e l F 5 A) の発現を抑制することにより、炎症促進性サイトカインの発現を抑制し、炎症性腸疾患の治療を行うことが報告されている(特許文献2)。更には、インターロイキン12の40kDaサブユニット及び/又は35kDaの発現を阻害し、インターロイキン12の発現抑制により、炎症性腸疾患、特にクローン病の治療を行うことが報告されている(特許文献3)。

しかしながら、炎症性腸疾患の原因が様々に予想される中、まだ、的確な治療方法と考えられるものは、見出されていない現状である。

先行技術文献

特許文献

特許文献1：特表2012-531204号公報

特許文献2：特開2011-26343号公報

特許文献3：特表2008-532540号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

本発明は、CD98の機能性核酸による炎症性腸疾患の治療用医薬組成物の提供を目的とする。特に、CD98重鎖の発現を抑制するs i R N Aを有効成分とする炎症性腸疾患の治療用医薬組成物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

本発明者は、アミノ酸輸送に係るCD98に着目し、CD98重鎖の発現を抑制するs i R N Aを用いて、その作用効果を検討して来た。まず、CD98の重鎖に対するs i R N Aを用いて、糖尿病NODマウスの治療を行な

ったところ、上記 s i R N A が 1 型糖尿病の進行を抑制すると共に、1 型糖尿病を治療できることを見出している（P C T / J P 2 0 1 2 / 0 7 5 5 8 7）。即ち、作用機序は明瞭ではないが、膵臓 β 細胞のアポトーシスに基づく 1 型糖尿病に対して、本抗体が非常に有効であることが示された。更に関節リウマチにも、本発明の s i R N A は有効であることが示されている。このことから、本発明の C D 9 8 の s i R N A は、1 型糖尿病や関節リュウマチの原因と考えられる自己免疫疾患に有効と考えられた。そこで、本発明者らは、本発明の s i R N A を使用して、自己免疫疾患の可能性が高い炎症性腸疾患の治療を検討した。その結果、ラットの炎症性腸疾患モデルにおいても、図 3 と図 4 に示すように、炎症性腸疾患を治療できることを見出した。

本発明者は、以上の知見に基づいて本発明を完成した。

すなわち本発明は以下のとおりである。

(1) C D 9 8 重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効成分とする、炎症性腸疾患の治療用医薬組成物。

(2) 上記機能性核酸が s i R N A である、上記 (1) に記載の医薬組成物。

(3) 上記炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である、上記 (1) 又は (2) に記載の医薬組成物。

(4) 上記 s i R N A が二本鎖 R N A である、上記 (2) に記載の医薬組成物。

(5) 上記二本鎖 R N A が、配列番号 1 と配列番号 2、配列番号 3 と配列番号 4、あるいは配列番号 5 と配列番号 6 の一つ以上を含有する s i R N A である、上記 (4) に記載の医薬組成物。

(6) 上記二本鎖 R N A が、配列番号 7 と配列番号 8、配列番号 9 と配列番号 1 0、あるいは配列番号 1 1 と配列番号 1 2 の一つ以上を含有する s i R N A である、上記 (4) に記載の医薬組成物。

(7) 配列番号 1 と配列番号 2、配列番号 3 と配列番号 4、あるいは配列番号 5 と配列番号 6 のいずれかの配列を有する二本鎖 s i R N A。

(8) 二本鎖 R N A 部分が、配列番号 7 と配列番号 8、配列番号 9 と配列番号 1 0、あるいは配列番号 1 1 と配列番号 1 2 のいずれかの配列を有する二

本鎖 s i R N A。

(9) 哺乳類に、CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効量投与することを特徴とする炎症性腸疾患の治療方法。

(10) 上記機能性核酸が、s i R N Aである、上記(9)に記載の治療方法。

5

(11) 上記 s i R N Aが、上記(7)または(8)の2本鎖 s i R N Aである、上記(10)に記載の治療方法。

(12) 上記炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又はクローン病である上記(9)～(11)のいずれかに記載の治療方法。

10

発明の効果

本発明によれば、CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を投与することにより、炎症性腸疾患に対する高い治療効果を得ることができる。そのため、本発明の s i R N Aを使用すれば、これまで効果的な治療方法のなかった、炎症性腸疾患の有効な治療方法となることができる。

15

図面の簡単な説明

図1は1型糖尿病を発症したNODマウスのT細胞を重症複合型免疫不全症のNODモデルマウス(NOD-SCIDマウス)に投与する。投与後のマウスに、CD98重鎖に対するマウス s i R N A (4 n m o l / m o u s e)、あるいはコントロールの s i R N Aを、2日目、5日目、8日目に投与する。なお、T細胞を投与した日を起算日とする。

20

図1は、3日後の末梢血単核球細胞のCD98重鎖の発現をフローサイトメトリーで評価した図である。灰色(GRAY)の部分は、CD98抗体を投与した場合の測定結果である。点線部分は、コントロールの s i R N Aを投与した場合の測定結果であり、実線部分は、CD98重鎖に対する s i R N Aを投与した場合の測定結果を示している。即ち、本発明の s i R N Aは、WO2011/118804に記載の抗CD98抗体と同じ効果を示すことが示されている。

25

図2はマウスを用いた炎症性腸疾患モデルの作成方法と、本発明の s i R N A の投与スケジュールを表わした図である。

5 図3は炎症性腸疾患モデルマウスを使用し、s i R N A を1日目、3日目、5日目、7日目に4回腹腔内投与した場合の、ラットの体重変化を表わした図である。マウス s i R N A の投与により、炎症性腸疾患の発症が抑制され、体重減少が抑制されている。

図4は炎症性腸疾患モデルマウスの、臨床スコアと組織学的スコアを評価した図である。マウス s i R N A の投与により、臨床スコアおよび組織学的スコアの両者が抑制されている。

10 図5はヒトTリンパ腫由来の J u r k a t 細胞に対してヒト s i R N A を投与し、細胞表面における C D 9 8 タンパクの発現の変化を、フローサイトメーターで測定、評価した図である。無処置群、コントロール s i R N A 投与群と比較し、ヒト s i R N A を投与することにより、C D 9 8 タンパクの発現の抑制が大きく抑制されたことを示している。

15 図6は炎症性腸疾患モデルマウスを使用し、マウス抗 C D 9 8 抗体を0日目から3日おきに5回腹腔内投与した。なお、コントロールとして、ラット I g G を使用した。その場合の、マウスの体重変化を表わした図である。マウス抗 C D 9 8 抗体の投与により、炎症性腸疾患の発症が抑制され、体重減少が抑制されている。以上のように、本発明の s i R N A の効果は、抗 C D
20 9 8 抗体によっても同様に検証されている。

図7は炎症性腸疾患モデルマウスの、臨床スコアと組織学的スコアを評価した図である。マウス抗 C D 9 8 抗体の投与により、臨床スコアおよび組織学的スコアの両者が抑制されている。以上のように、本発明の s i R N A の効果は、抗 C D 9 8 抗体によっても同様に検証されている。

25

発明を実施するための形態

本発明の一つの態様は、「C D 9 8 重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効成分とする炎症性腸疾患の治療用医薬組成物」に関するものである。ここで「C D 9 8」は公知のタンパク質であり、D N A 配列とアミノ酸配列は、特

開 2 0 0 9 - 1 8 9 3 7 6 号公報に記載されている。本発明における「CD 9 8」は、これらの配列に限定されるものではなく、CD 9 8 の機能が保持される限り、アミノ酸やDNAの変異数や変異部位には制限はないものとする。

5 なお、CD 9 8 とは、細胞膜上に幅広く発現している約 1 2 0 k D a のヘテロ 2 量体の糖タンパク質であり、アミノ酸輸送、増加した細胞膜発現とインテグリンが仲介する接着に付随する細胞融合に関連すると考えられている。CD 9 8 の構造は、約 8 0 k D a I I 型膜貫通型タンパク質 CD 9 8 h c (重鎖 : 4 F 2 h c、S L C 3 A 2) と 6 種類ある約 4 0 k D a の軽鎖 (L A T 1, L A T 2, y + L A T 1, y + L A T 2, x C T, a s c) の 1 つとジ
10 スルフィド結合によるヘテロ 2 量体を構成し、アミノ酸トランスポーターとして機能している。CD 9 8 の重鎖 (CD 9 8 h c) は細胞膜に 2 量体を移動させる役割を持ち、軽鎖 (l c) がトランスポーターの機能を持つと考えられている。

15 また、CD 9 8 重鎖は、上皮細胞の血管側の細胞膜に存在し、上記のトランスポーターを上皮細胞の血管側の細胞膜へ移送する働きをしている。

 そのため、一般的には、CD 9 8 重鎖の発現を抑制すると、CD 9 8 (重鎖と軽鎖の複合体) のアミノ酸輸送が抑制されると考えられたが、本発明の CD 9 8 の重鎖に対する s i R N A の場合には、アミノ酸輸送をあまり抑制
20 するようには見えなかった。

 本発明において「機能性核酸」とは、タンパク質の発現を抑制できる機能を持った s i R N A、m i R N A、アプタマー、リボザイム、アンチセンス核酸のことを言う。好ましいものとしては、s i R N A を挙げる
25 ことができる。即ち、本発明の s i R N A とは、CD 9 8 重鎖の遺伝子発現を抑制する s i R N A をさす。具体的には、対照群 (コントロール s i R N A を使用した場合) と比較して CD 9 8 の遺伝子発現を 5 0 % 以上抑制できる s i R N A を、好ましくは 8 0 % 以上抑制できる s i R N A をいう。s i R N A は、RNA 干渉と呼ばれる配列特異的な遺伝子発現の抑制を誘導することが知られている。s i R N A は、一般的に二本鎖の RNA 部分と、センス鎖および

アンチセンス鎖の3'末端のオーバーハング部分から構成される。siRNAは、当業者にとって公知の方法によって設計することができる。例えば、選択したDNA配列（19～21塩基が望ましい）をそのままRNA配列に変換したもの（センス鎖）とそのアンチセンス鎖を二本鎖RNA部分とし、
5 オーバーハング部を付加する。オーバーハング部は、1又は2塩基の任意の核酸（リボ核酸またはデオキシ核酸）であるが、ウリジン（U）もしくはチミジン（dT）が好ましい。本発明のsiRNAは、CD98、好ましくはヒトのCD98重鎖のDNA配列に基づいて設計され、CD98重鎖の発現を抑制できるsiRNAであれば、特に限定されるものではない。発現の抑制は、CD98重鎖に特異的であることが望ましい。特異的であるかどうかは、一般公開されているBLAST検索を実施することにより確認できる。
10 またオーバーハング部分は必須ではない。

また本発明のsiRNAには、投与対象内で本発明のsiRNAと同じ効果を有する任意の分子も含まれる。このような分子としては、例えば、shRNAが挙げられる。shRNAとはショートヘアピン構造型のRNAであり、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。二本鎖RNA部分が、本発明のsiRNAと同一構造を有するshRNAも本発明のsiRNAに含まれる。他には、投与対象に投与することによって本発明のsiRNAを発現することができるようなDNAも本発明のsiRNAに含まれる。このようなDNAは、siRNAをコードするDNAを発現ベクター（例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルスなどのベクター）に組み込んで構築して使用される。
15

本発明において、機能性核酸を医薬組成物として使用する場合には、治療薬としての特性を改善するための修飾、あるいはリポソームなどの輸送担体に含包することが望ましい。ポリヌクレオチドの治療薬としての特性を改善するには、ヌクレオチドの修飾または類似体を導入することができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性の向上および／または細胞透過性の向上などである。ヌクレアーゼ耐性は、アンチセンス、siRNA、shRNAおよび／また
20

はリボザイムの生理活性を妨げないような技術上周知の任意の方法によりもたらされる。ヌクレアーゼ耐性の向上を目的にオリゴヌクレオチドに加えることができる修飾の例としては、リン酸骨格中のヘテロ原子のリンまたは酸素の修飾である。例えば、メチルリン酸、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびモルホリノオリゴマーなどである。また、技術上周知の他の修飾により、生理活性は維持したまま、ヌクレアーゼに対する安定性を大幅に高めるようにしてもよい。

5

更に、本発明において機能性核酸を医薬組成物や治療方法として使用する場合には、機能性核酸そのものを治療に用いる方法と、ベクターを用いて機能性核酸を発現させて治療に用いる方法が存在する。

10

機能性核酸そのものを治療に用いる場合には、アテロコラーゲン等の安定化剤、pH調節剤などを添加した水溶液を作製し、そのまま非経口で投与することが望ましい。

ベクターを用いて *in vivo* 発現を行なう場合には、特に本発明の治療を必要とする患者体内での発現に際しては、発現ベクター、特に哺乳動物発現ベクターを使用するのが望ましい。発現ベクターは技術上周知であり、好ましくはプラスミド、コスミド、ウイルス発現系を含む。好ましいウイルス発現系の例としてはアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスなどである。また細胞や組織にベクターを導入する方法は技術上周知である。好ましい例としては、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、および組み換えウイルスベクターによる感染などである。

15

20

本発明の「哺乳動物」とは、例えばラット、マウス、モルモット等のげっ歯類、例えばイヌやネコ、更には例えばヒトやサルの霊長類を挙げることができる。

25

本発明の「炎症性腸疾患」とは、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病を挙げることができる。

本発明の2つ目の態様は、「CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効量投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法」に関するものである。

本発明の医薬組成物を用いて、炎症性腸疾患を治療する際には、上記の機能性核酸と共に、通常の製剤学的に許容しうる1又は2種以上の製剤用添加物を用いて医薬組成物を製造して投与することが好ましい。本発明の医薬組成物の投与方法は非経口投与が望ましく、静脈投与、筋肉内投与、腹腔内投与、または皮下投与などを行うことができる。

本発明の機能性核酸の投与量は、投与対象、投与方法等により異なるが、例えば非経口投与する場合は、自己免疫疾患の患者（60kg）に対して、例えば、一日約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射することができる。

なお、本発明の態様で、前項と共通に使用される用語は、前項と同じ意味を表わすものとする。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、実施例は本発明をより良く理解するために例示するものであって、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されることを意図するものではない。

（実施例1）本発明のCD98重鎖の発現抑制用のsiRNAと、CD98の重鎖に対する抗CD98抗体（WO2011/118804）との対比試験

1) 実験材料：

a) 動物：

1型糖尿病モデルマウス（NODマウス）：NOD-SCIDマウスは、日本SLC社（浜松、日本）から購入した。すべてのマウスは徳島大学の動物センター内で無菌条件下で飼育され、すべての実験は動物の管理と利用のガイドラインに則って実施された。

NODマウスの糖尿病発症状況は、このマウスの尿中の糖濃度と空腹時の血糖値を一週間毎に測定してモニターした。250mg/dl以上の血中濃度を持つマウスが糖尿病であるとした。NODの雌性マウスが20～25週令になると80%以上の割合で、1型糖尿病になる。

b) フローサイトメトリー :

脾臓、脾臓リンパ節、脾臓から得られるリンパ球は、CD4、CD8、TCRV α 2とTCRV β 5に対する蛍光色素の結合抗体 (eBioscience社、UAS) で染色された。幾つかの実験では、細胞をメモンシンの存在下、250ng/mlのPMA (シグマ社) と1 μ g/mlのイオノマイシン (シグマ社) で5時間刺激し、CD4又はCD8用の表面染色をした。更に、グランザイムB、IFN- γ 又はIL-17用の細胞内染色をした。7-アミノアクチノマイシンD (シグマ社) は、死細胞を除くために使用された。

10 実験操作は、マニュアルに則って実施した。データは、FACSのコントロール下で集計され、FlowJoソフト (スリースター、米国) を使用して行った。

c) マウス siRNA :

15 CD98重鎖の発現抑制用の下記表1の3種のマウス siRNAの混合物、又は標的遺伝子を持たないコントロールの siRNA (B-Bridge社) を作製し、使用した。

[表1]

siRNA	番号	センス	アンチセンス
Mouse Sic3a2	SMF27A-2086-1	guacagagguggggcacaTT (配列番号1)	ugugccaccaccucuguacTT (配列番号2)
	SMF27A-2086-2	cuacaaagugccaagaaaaTT (配列番号3)	uuuucuuggcacuuuguagTT (配列番号4)
	SMF27A-2086-3	gggaccagaaugagcguaTT (配列番号5)	uaacgcucauucugguccTT (配列番号6)
Negative Control	#1	auccgcgcgauaguacguaTT	uacguacuauccgcgcggauTT
	#2	uuacgcguagcguaauacgTT	cguauuacgcucacgcguaaTT
	#3	uauucgcgcguauagcggTT	accgcuaauacgcgcgaauaTT

2) 方法 :

20 上記CD98重鎖の発現抑制用の3種の siRNAの混合物、又は標的遺伝子を持たないコントロールの siRNAとアテロコラーゲン (高研、日本)

とを実験手順書に従い混合し、s i R N A 溶液を調製した。

糖尿病NODマウスのT細胞が投与された重症複合型免疫不全症モデルマウス（S C I Dマウス）に、上記s i R N A 溶液を4 n m o l /マウスになるように腹腔内投与した。s i R N A の投与スケジュールは、2日目、5日目と8日目である。なお、T細胞が投与された日を起算日とする。上記s i R N A 溶液の投与後3日目に、血液を採取し、白血球を単離して、抗マウスC D 9 8 抗体で染色して、フローサイトメトリーで評価した。

3) 結果：

フローサイトメトリーでの評価結果を図1に示す。灰色（G R A Y）の部分は、抗C D 9 8 抗体を投与した場合の測定結果である。点線部分は、コントロールのs i R N A を投与した場合の測定結果であり、実線部分は、C D 9 8 重鎖に対するs i R N A を投与した場合の測定結果を示している。

この結果は、本発明のC D 9 8 重鎖をターゲットとするs i R N A が、C D 9 8 重鎖をターゲットとする抗C D 9 8 抗体と同じように使用できることを示している。

（実施例2）C D 9 8 重鎖の発現抑制用のs i R N A による炎症性腸疾患の進行抑制試験

1) 実験材料：

炎症性腸疾患モデルマウスの作製：

D B A / 1 J マウス（7週齢の雌、10匹）のそれぞれ2群に分け、図2に示すようにマウスC D 9 8 に対するs i R N A を投与した。

2) 方法：

S C I Dマウス（雌性）にB A L B / cマウス（雌性）の脾臓から採取した、C D 4 陽性C D 2 5 陰性T細胞（ 1×10^6 /マウス）を移入した。T細胞を移入した日を起算日として、実施例1に記載の3種のs i R N A 混合溶液を4 n m o l /マウスになるように腹腔内投与した。s i R N A の投与スケジュールは、1日目、3日目、5日目、7日目と4回のs i R N A の投与を行った。

なお、s i R N A 混合溶液は、実施例1に記載のようにs i R N A をアテ

ロコラーゲンと用事調整で混合し、作製後直ちにマウスに投与した。

3) 結果：

5 上記の炎症性腸疾患モデルマウス（SCIDマウス）にCD98重鎖の siRNAを投与したところ、図3に示すように、炎症性腸疾患の進行を抑制でき、体重減少を抑制できることが分かった。

以上のように、CD98重鎖をターゲットとする siRNAを用いて、炎症性腸疾患を治療できることを明らかにした。

また、図4に示されるように、マウス siRNAの投与により、臨床スコアおよび組織学的スコアの両者が抑制されると言うことが明らかになった。

10 (実施例3) CD98重鎖の発現抑制用の siRNAによるヒト白血病T細胞（Jurkat細胞）のCD98発現進行抑制試験

1) 実験材料：

・ Jurkat細胞： ヒトCD98タンパクを高発現する Jurkat細胞をATCCから購入した。

15 ・ トランスフェクション試薬（FuGENE8）：非リポソーム系トランスフェクション試薬であるFuGENE8をロシュ・アプライド・サイエンス社から購入した。

・ ヒト siRNA：

20 CD98重鎖の発現抑制用の下記表2の3種のヒト siRNAの混合物の siRNAを作製（B-Bridge社に依頼）し、使用した。

[表2]

siRNA	番号	センス	アンチセンス
Human CD98	hCD98si#1	cuggucuucaacucuuggccTT (配列番号7)	ggccaagaguugaagaccacTT (配列番号8)
	hCD98si#2	cuggugccguggucauaaucTT (配列番号9)	gauuaugaccacggcaccacTT (配列番号10)
	hCD98si#3	gguucuccacucagguugacTT (配列番号11)	gucaaccugaguggagaaccTT (配列番号12)

2) 方法：

Jurkat細胞にCD98に対して上記ヒトsiRNAを使用し、Fugene8をつかって遺伝子導入し、2日後に細胞表面上のCD98発現をFITC標識したヒトCD98抗体を用いて、フローサイトメーターで測定し、非処理を100としたときの発現量を測定した。

3) 結果：

Jurkat細胞表面におけるCD98発現の比率をフローサイトメーターにより測定、評価し、その結果を図5に示す。図5に示されるように、コントロールsiRNA投与群では、CD98のタンパク発現は非処理群と同じであった。しかし、ヒトsiRNAの投与群では、CD98のタンパク発現が約75%抑制された。

以上のことは、これらの3種のヒトsiRNAを使用して、炎症性腸疾患の治療ができることを示している。

(試験例1) CD98重鎖に対する抗CD98抗体による炎症性腸疾患の進行抑制試験

1) 実験材料と方法：

実施例2の結果を検証するため、同様に炎症性腸疾患モデルマウス(SCIDマウス、8週令、雌性)を作製した。T細胞を移入した日を起算日として、マウス抗CD98抗体(WO2011/118804に記載、200 μ g/回)を移入日から3日おきに5回投与した。なお、コントロールとして、ラットIgGを使用した。

2) 結果：

A：体重増加率：

図6に示すように、実施例2のCD98siRNAと同様に、マウス抗CD98抗体を用いても、炎症性腸疾患の進行を抑制でき、体重減少が抑制できた(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

B：臨床スコアおよび組織学的スコアの平均：

図7に示すように、マウス抗CD98抗体を用いても炎症性腸疾患の進行を抑制でき、臨床スコアおよび組織学的スコアの両者が抑制され、実施例2

のCD98 siRNAを用いた場合と同じ結果を得た。

以上のように、実施例2の siRNAの効果は、抗CD98抗体によっても同様に検証されている。

5 産業上の利用可能性

本発明の炎症性腸疾患の治療用医薬組成物は、 siRNAによるCD98の重鎖の発現抑制という新たな作用機序により、これまで適切な治療方法がなかった炎症性腸疾患の治療を可能にするものである。

請求の範囲

[請求項1]

CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効成分とする、炎症性腸疾患の治療用医薬組成物。

5 [請求項2]

上記機能性核酸がsiRNAである、請求項1記載の医薬組成物。

[請求項3]

上記炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

10 [請求項4]

上記siRNAが二本鎖RNAである、請求項2に記載の医薬組成物。

[請求項5]

上記二本鎖RNAが、配列番号1と配列番号2、配列番号3と配列番号4、あるいは配列番号5と配列番号6の一つ以上を含有するsiRNAである、
15 請求項4に記載の医薬組成物。

[請求項6]

上記二本鎖RNAが、配列番号7と配列番号8、配列番号9と配列番号10、あるいは配列番号11と配列番号12の一つ以上を含有するsiRNA
20 である、請求項4に記載の医薬組成物。

[請求項7]

配列番号1と配列番号2、配列番号3と配列番号4、あるいは配列番号5と配列番号6のいずれかの配列を有する二本鎖siRNA。

[請求項8]

二本鎖RNA部分が、配列番号7と配列番号8、配列番号9と配列番号10、あるいは配列番号11と配列番号12のいずれかの配列を有する二本鎖
25 siRNA。

[請求項9]

哺乳類に、CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効量投与することを特徴とする炎症性腸疾患の治療方法。

[請求項10]

上記機能性核酸が、s i R N Aである、請求項9記載の治療方法。

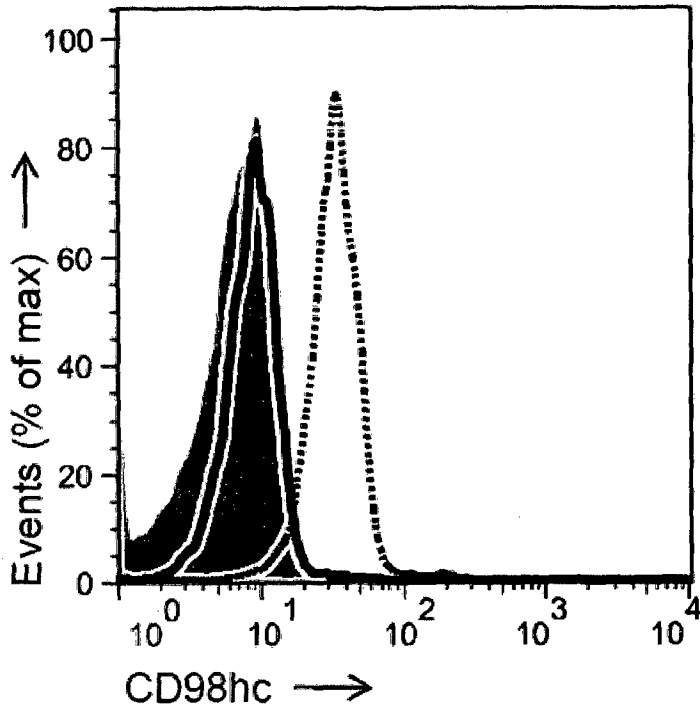
[請求項11]

5 上記s i R N Aが、請求項7または8に記載の2本鎖s i R N Aである、
請求項10に記載の治療方法。

[請求項12]

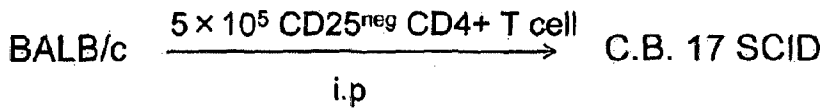
上記炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項9～1
1のいずれかに記載の治療方法。

図 1

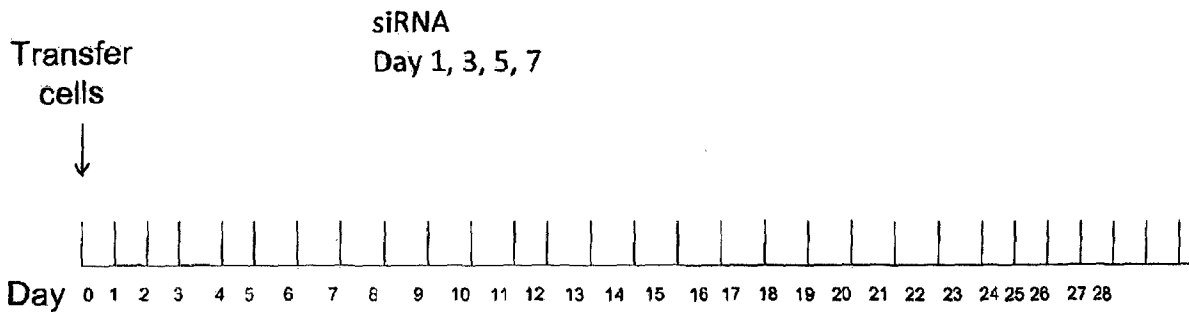


Gray; unstained
Bold; CD98 siRNA
Dot; Control siRNA

図 2



Group 1: CD25^{neg} CD4⁺ T cell (control siRNA)
Group 2: CD25^{neg} CD4⁺ T cell (CD98 siRNA)



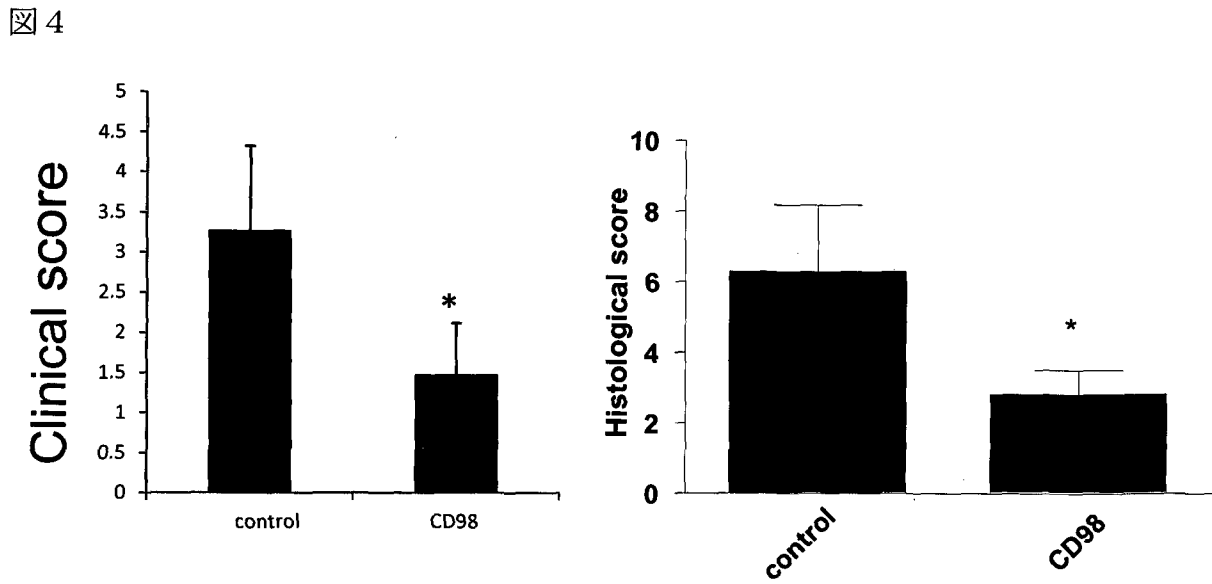
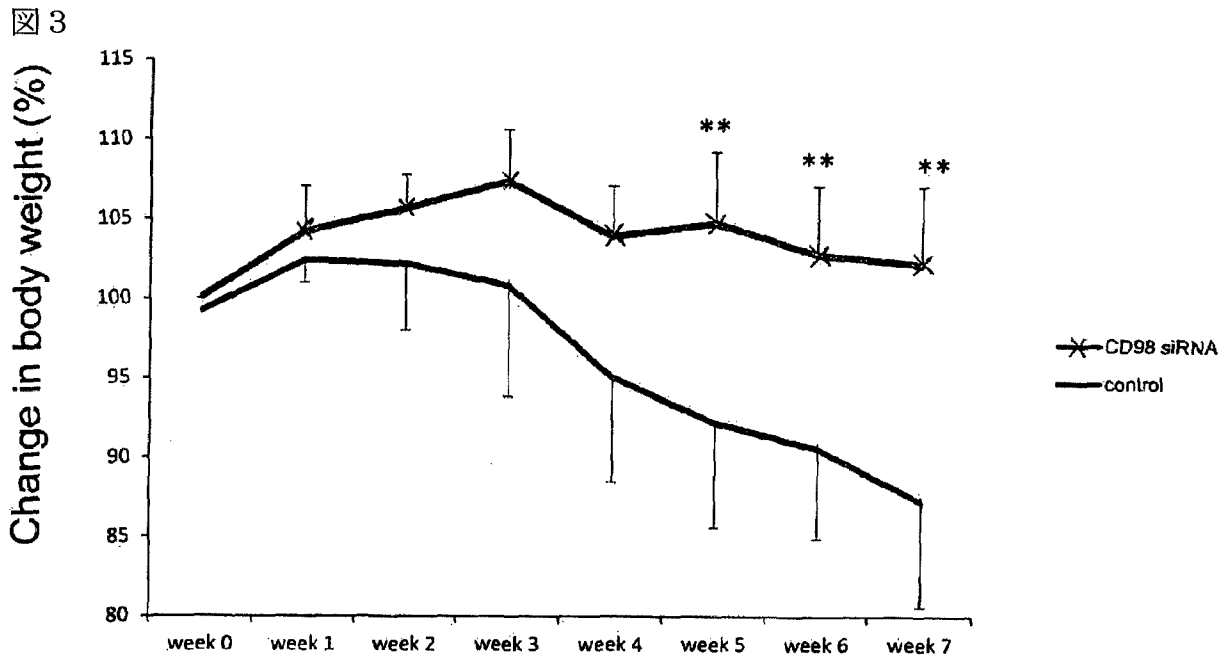


図 5

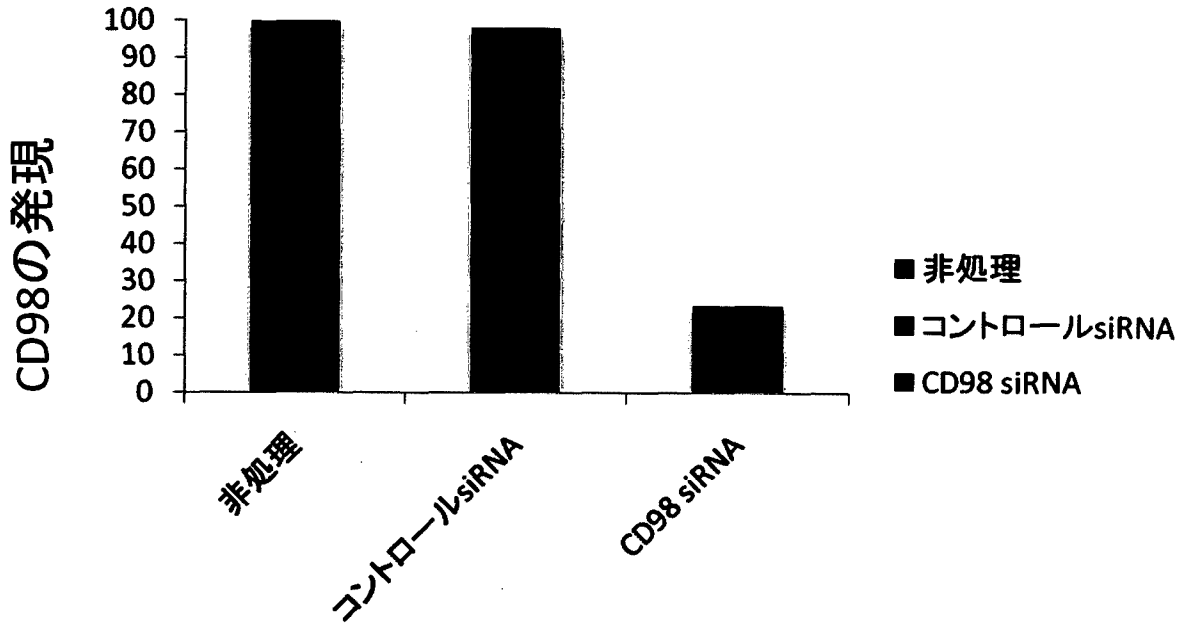


図 6

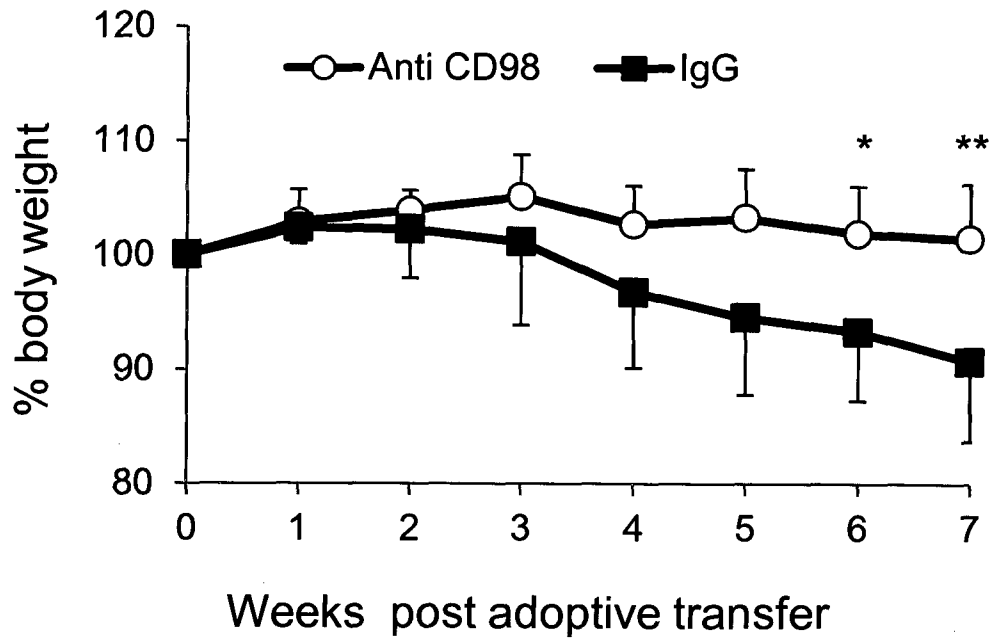
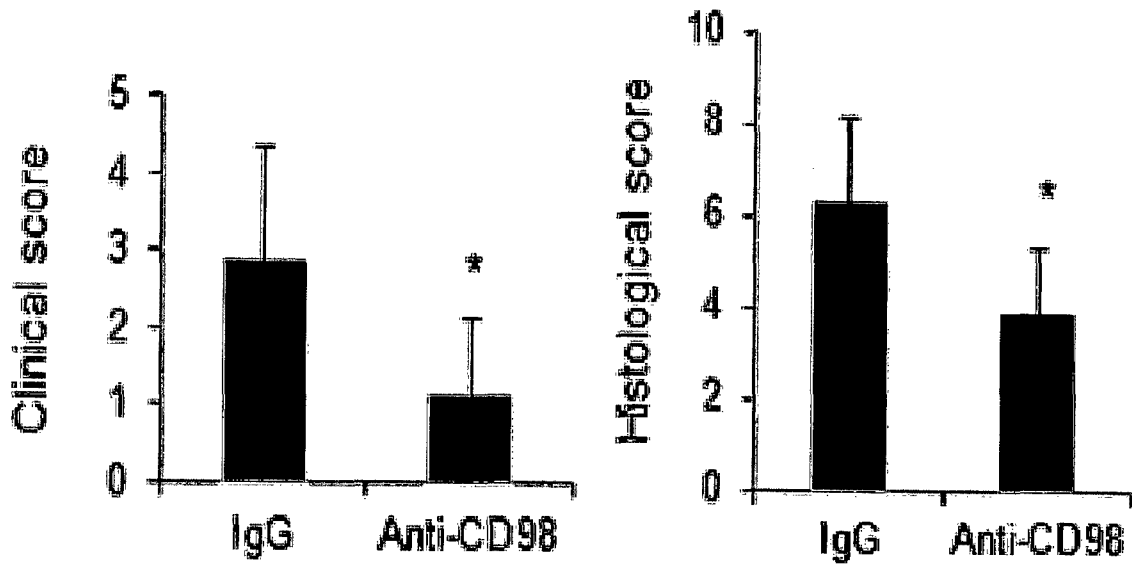


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 A61K48/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K48/00, A61K31/713, A61P1/04, C12N15/113

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Laroui H. et al., Silencing of CD98 Expression Using a Nanoparticle-Based Delivery System Ameliorates Induced Colitis in Mice., Gastroenterology, 2011, Vol.140, No.5, Suppl. 1, pages S10 to S11, ISSN: 0016-5085	1-8
X	Nguyen H.T. et al., CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice., Journal of Clinical Investigation, 2011, Vol.121, No.5, pages 1733 to 1747, ISSN: 0021-9738	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 07 May, 2014 (07.05.14)	Date of mailing of the international search report 20 May, 2014 (20.05.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Charania M.A. et al., Intestinal epithelial CD98 synthesis specifically modulates expression of colonic microRNAs during colitis., American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology., 2012, Vol.302, No.11, pages G1282 to G1291, ISSN: 0193-1857	1-8
Y	Charania M.A. et al., Intestinal epithelial CD98 directly modulates the innate host response to enteric bacterial pathogens., Infection and Immunity, 2013.01.07, [online], doi:10.1128/IAI.01388-12, Retrieved from the internet: <URL:http://iai.asm.org/content/81/3/923.full.pdf+html> (Vol.81, No.3, pages 923 to 934)	5-8
Y	Kudo Y. et al., RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells., FEBS Letters, 2004, Vol. 577, No.3, pages 473 to 477, ISSN: 0014-5793	5-8
Y	Pinho M.J. et al., Overexpression of non-functional LAT1/4F2hc in renal proximal tubular epithelial cells from the spontaneous hypertensive rat., Cellular Physiology and Biochemistry, 2007, Vol.20, No.5, pages 535 to 548, ISSN: 1015-8987	5-8
Y	JP 2010-540595 A (VIB VZW), 24 December 2010 (24.12.2010), paragraph [0060]; table 2; fig. 4 & WO 2009/043922 A2 & EP 2201117 A1 & US 2011/0008350 A1	5-8
A	WO 2011/118804 A1 (The University of Tokushima), 29 September 2011 (29.09.2011), & EP 2554552 A1 & US 2013/0052197 A1	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054778

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 to 12 pertain to method for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054778

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

With respect to Box No. III:

The inventions set forth in claims 1 to 4 and the inventions set forth in claims 7 and 8 are common to each other exclusively in relating to a double-stranded siRNA. As described in document 1, however, there have been known medicinal compositions for treating inflammatory bowel diseases that comprise, as an active ingredient, a functional nucleic acid (a double-stranded siRNA) capable of inhibiting the expression of CD98 heavy chain. Thus, the above common matter cannot be considered as a special technical feature under the provision of Rule 13.2 of the Regulations under the PCT.

Consequently, since the inventions set forth in claims 1-4 and the inventions set forth in claims 7 and 8 do not share a novel special technical feature between general inventive concepts of both the inventions, it is not considered that these inventions are relevant to a group of inventions which are so linked as to form a single general inventive concept.

Document 1: Laroui H. et al., Silencing of CD98 Expression Using a Nanoparticle-Based Delivery System Ameliorates Induced Colitis in Mice., Gastroenterology, 2011, Vol.140, No.5, Suppl. 1, pages S10 to S11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K48/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K48/00, A61K31/713, A61P1/04, C12N15/113			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	Laroui H. et al., Silencing of CD98 Expression Using a Nanoparticle-Based Delivery System Ameliorates Induced Colitis in Mice., Gastroenterology, 2011, Vol.140, No.5, Suppl. 1, pages S10 to S11, ISSN: 0016-5085	1-8	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 07.05.2014		国際調査報告の発送日 20.05.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小森 潔	4U 3762
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Nguyen H.T. et al., CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice., Journal of Clinical Investigation, 2011, Vol.121, No.5, pages 1733 to 1747, ISSN: 0021-9738	1-8
Y	Charania M.A. et al., Intestinal epithelial CD98 synthesis specifically modulates expression of colonic microRNAs during colitis., American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology., 2012, Vol.302, No.11, pages G1282 to G1291, ISSN: 0193-1857	1-8
Y	Charania M.A. et al., Intestinal epithelial CD98 directly modulates the innate host response to enteric bacterial pathogens., Infection and Immunity, 2013.01.07, [online], doi:10.1128/IAI.01388-12, Retrieved from the internet: <URL:http://iai.asm.org/content/81/3/923.full.pdf+html> (Vol.81, No.3, pages 923 to 934)	5-8
Y	Kudo Y. et al., RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells., FEBS Letters, 2004, Vol.577, No.3, pages 473 to 477, ISSN: 0014-5793	5-8
Y	Pinho M.J. et al., Overexpression of non-functional LAT1/4F2hc in renal proximal tubular epithelial cells from the spontaneous hypertensive rat., Cellular Physiology and Biochemistry, 2007, Vol.20, No.5, pages 535 to 548, ISSN: 1015-8987	5-8
Y	JP 2010-540595 A (フエー・イー・ベー・フエー・ゼット・ウエー) 2010.12.24, 【0060】、表2、図4 & WO2009/043922 A2 & EP 2201117 A1 & US 2011/0008350 A1	5-8
A	WO 2011/118804 A1 (国立大学法人徳島大学) 2011.09.29, & EP 2554552 A1 & US 2013/0052197 A1	1-8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 9-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項9-12は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページを参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

<第 III 欄について>

請求項 1-4 に記載される発明と請求項 7, 8 に記載される発明は、二本鎖 s i R N A の点でのみ共通するものであるが、C D 9 8 重鎖の発現を抑制する機能性核酸(二本鎖 s i R N A)を有効成分とする、炎症性腸疾患の治療用医薬組成物は、文献 1 に記載されるように既に知られた事項であるから、この点について P C T 規則 1 3. 2 における特別な技術的特徴とすることはできない。

よって、請求項 1-4 に記載される発明と請求項 7, 8 に記載される発明の一般的発明概念の間には、新規な特別な技術的特徴が共有されていないことから、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成しているように連関している一群の発明であるとは認められない。

文献 1 : Laroui H. et al., Silencing of CD98 Expression Using a Nanoparticle-Based Delivery System Ameliorates Induced Colitis in Mice., Gastroenterology, 2011, Vol.140, No.5, Suppl. 1, pages S10 to S11